مطالعه پلی‌مورفیسم ژن کوآگولاز در *استافیلوکوکوس آرئوس*های جدا شده از شیر گاومیش

جلال شایق[1*]، علی رضا منادی[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، استادیار گروه دامپزشکی، شبستر، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، استادیار گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: jalal_shayeghi@yahoo.co.in
(دریافت مقاله: ۹۲/۵/۲۸ پذیرش نهایی: ۹۲/۹/۲۶)

چکیده

هدف از این مطالعه آنالیز ژن کوآگوالاز در *استافیلوکوکوس آرئوس*های جدا شده از شیر گاومیش‌های بومی در شمال غربی ایران بود. برای این منظور تعداد ۷۵ جدایه *استافیلوکوکوس آرئوس* به روش PCR-RFLP مورد آزمایش قرار گرفتند. نتیجه تکثیر شده برای ژن کوآگولاز تولید باندهای با اندازه‌های ۶۰۰، ۷۰۰، ۷۶۰ و ۸۵۰ جفت باز بود که به ترتیب ۱۲، ۲۵، ۲۹ و ۹ مورد از جدایه‌های مورد آزمایش را شامل می‌شد. از هضم باندهای مذکور با آنزیم AluI الگوهای متفاوتی از هر اندازه بدست آمد. اما الگوهای متعلق به یک اندازه، مشابه هم بودند. نتایج آنالیز ژن کواگولاز در این مطالعه مشابه نتایج حاصل از جدایه‌های گاوی بودند.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس آرئوس*، ژن کوآگولاز، پلی مورفیسم، شیر گاومیش، PCR-RFLP

مقدمه

حداقل ۳۰ گونه استافیلوکوکوس وجود دارد که اکثراً فلور طبیعی مخاط و پوست محسوب می‌شوند، برخی از آنان قادرند به‌صورت فرصت‌طلب ایجاد بیماری‌های مهمی را بنمایند، تولید آنزیم کوآگولاز با قدرت بیماری‌زائی آنان ارتباط مستقیم دارد. در این میان *استافیلوکوکوس آرئوس* اهمیت ویژه‌ای را داراست، چرا که می‌تواند به عنوان عامل بسیار مهم در ایجاد بیماری در دام مورد توجه قرار گیرد. همچنین از جمله بیماری‌های مهم که توسط این باکتری ایجاد می‌شود مسمومیت غذایی است که از بسیاری کشورهای جهان گزارش شده است (Razavilar, 1999). گاومیش‌ها حدوداً تولید ۵ در صد شیر در جهان را در اختیار داشته و در کشور ما نیز از منابع مهم تأمین شیر محسوب می‌شوند (Bromandi Jazi, 2006). اگر چه جداسازی و شناسایی آزمایشگاهی این باکتری کار چندان دشواری

نمی‌باشد، اما هنوز اپیدمیولوژی مولکولی بیماری نیاز به تجزیه و تحلیل بیشتری دارد (Dastmalchi Saei and Ahmadi, 2010). تاکنون روش‌های متعددی برای مطالعه مولکولی باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* پیشنهاد شده است که از آن جمله می‌توان به هضم کوروموزمی DNA (Busch and Weller, 2000) multilocus sequence typing (Nitschko, 1999; Enright et al., 2000)، pulsed-field gelelectrophoresis (Melles et al., 2007) و تعیین تیپ بر اساس آنالیز ژن‌های Spa (Strommenger et al., 2008)، کوآگولاز (Ishino et al., 2007) و *aroA* (Marcos et al., 1999) اشاره نمود. استفاده از این تعداد روش متعدد بر این فرض استوار است که سویه‌های محدودی از *استافیلوکوکوس آرئوس* در ایجاد مسمومیت‌های غذایی یا بیماری خاص دخالت دارند (Fitzgerald et al., 1997). از آنجایی که عمده این مطالعات بر روی نمونه‌های گاوی، انسانی و حتی گوسفندی تمرکز داشته‌اند، مطالعه بر روی سویه‌های گاومیشی که جزو احشام مهم تولیدی منطقه می‌باشد می‌تواند به عنوان مطالعه‌ای ره‌گشا در این زمینه باشد.

اگرچه مطالعاتی در خصوص بررسی پلی مورفیسم ژن کوآگولاز در مورد جدایه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* گاو از جمله در ایران انجام پذیرفته (Dastmalchi Saei et al., 2009)، اما تاکنون مطالعه‌ای در خصوص جدایه‌های استافیلوکوکوس گاومیشی انجام نپذیرفته است. هدف از این مطالعه تعیین پلی مورفیسم ژن کوآگولاز *استافیلوکوکوس آرئوس*های جدا شده از شیر گاومیش در شهرستان تبریز بر اساس روش PCR-RFLP می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

تعداد ۷۵ جدایه از *استافیلوکوکوس آرئوس*های جدا شده از شیر گاومیش که قبلا از سطح دامداری‌های سنتی شهرستان تبریز جمع‌آوری شده بود تهیه و به عنوان نمونه‌های مورد مطالعه استفاده شد. بر روی کلیه نمونه‌ها آزمایش‌های کامل بیوشیمیایی انجام شده و جهت حصول اطمینان بیشتر با استفاده از روش واکنش PCR برپایه ژن نوکلئاز (nuc) نیز تعلق آنها به گونه *استافیلوکوکوس آرئوس* اثبات شده بود (Shayegh et al., 2013).

استخراج DNA

استخراج DNA از ۷۵ نمونه کشت داده شده در محیط آبگوشت قلب – مغز انجام شد. یک میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی در شتاب g ×۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بعد از ریختن بافر لیزکننده شامل تریس ۱ مولار (pH= ۷/۵)، کلرید سدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار، C-TAB ۲ درصد بر روی رسوب مخلوط در دمای ٦٥ درجهٔ سلسیوس به مدت دو ساعت در بن ماری قرار داده شده و سپس ویال‌های حاوی سلول‌های لیزشده به مدت ۵ دقیقه در شتاب g ×۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی به ویال‌های دیگر منتقل و هم حجم آن کلروفرم-ایزوآمیل الکل با نسبت های ۱:۲٤ به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد. پس از تشکیل دو فازمایع در ویال و برداشتن لایهٔ رویی و انتقال به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر، ۰/۵ میکرولیتر RNAase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس در بن ماری قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه، ویال‌ها را برداشته و

هم حجم آنها ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- قرار داده شد. با سانتریفیوژ در شتاب g ×۱۲۰۰۰، DNA ترسیب و با قرار دادن ویال‌ها در دمای اتاق، DNA خشک گردید. در پایان، DNA خشک شده در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید (Shayegh et al., 2013).

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای ژن کواگولاز

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل کیت مستر PCR ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی (MWG, Germany) ۰/٤ میکرومولار (جدول۱) و DNA استخراج شده شامل ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) انجام گرفت. واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی در دستگاه ترموسایکلر (Techne) با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و نهایتا یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Hookey et al., 1998). از محصولات حاصله در آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز و با استفاده از ژل داکیومنت (Uvitech) عکسبرداری انجام گرفت.

جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

نام ژن	توالی	منبع
COA	F; 5-ATA,GAG,ATG,CTG,GTA,CAG,C R; 5- GCTTCC,GAT,TGT,TCG,ATGC	Hookey et al. ,1998

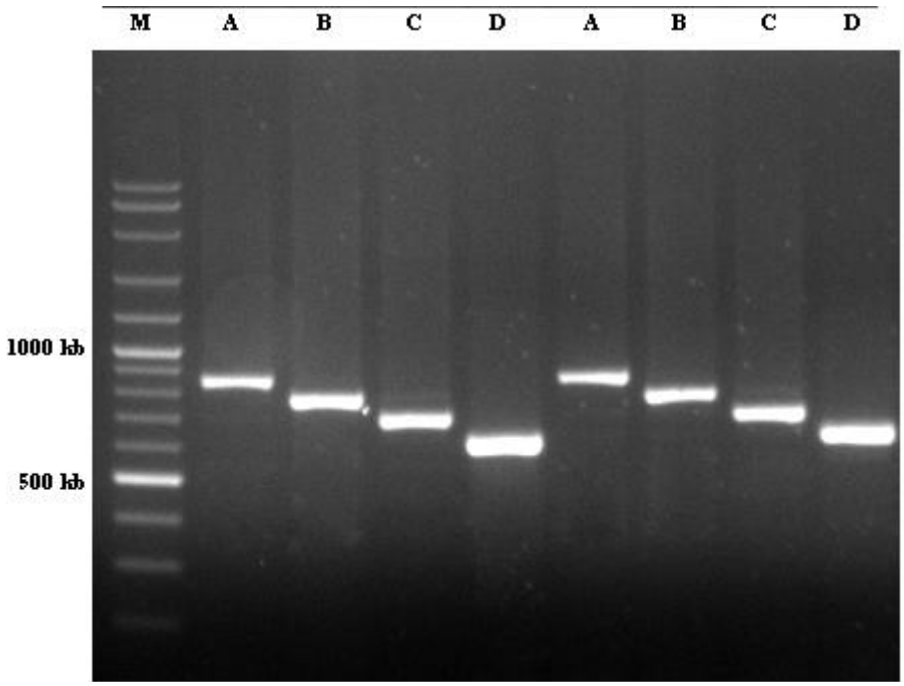
برش آنزیمی قطعات تکثیر شده ژن کواگولاز

برش آنزیمی پس از تکثیر ژن کواگولاز با پرایمرهای اختصاصی، با استفاده از آنزیم‌های برشی، اجرا شد. نوع آنزیم برشی بر اساس جایگاه برشی موجود در مقالات انتخاب شد. برای هر محصول PCR، دو بار واکنش هضم به طور جداگانه با آنزیم AluI (Fermentas) به عمل آمد. واکنش‌های هضم به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند و در پایان، محصولات هضم آنزیمی با استفاده از آگارز ۲ درصد الکتروفورز و نوارهای حاصل از برش در زیر نور UV مشاهده و عکس برداری انجام شد (Hookey et al., 1998).

یافته‌ها

نتایج انجام واکنش PCR و برش آنزیمی برای ژن کواگولاز

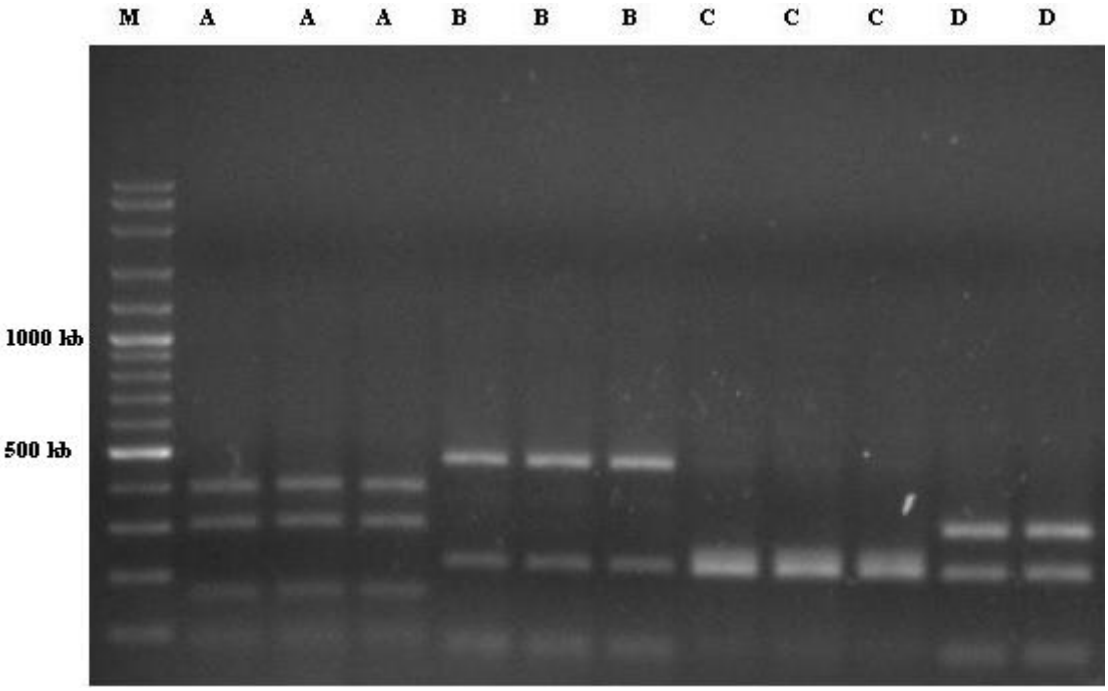
ژن کوآگولاز با استفاده از جفت آغازگرهای طراحی شده توسط Hookey و همکاران طی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز تکثیر داده شد که در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود محصولات تکثیری با اندازه‌های تقریبی ٦۰۰، ۷٦۰، ۷۰۰ و ۸۵۰ جفت نوکلئوتید حاصل شدند.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR نمونه های ژن کوآگولاز جداسازی شده از شیر گاومیش:
M: مارکر،A: باند ۸۵۰،B: ۷۶۰،C: ۷۰۰ و D: ۶۰۰ جفت باز

از ۷۵ نمونه *استافیلوکوکوس آرئوس* مورد مطالعه در این پژوهش تعداد ۱۲ نمونه حاوی ژن کوآگولاز دارای قطعه تکثیر bp ٦۰۰ جفت، ۲۵ نمونه قطعه تکثیر bp ۷۰۰، ۲۹ نمونه قطعه تکثیر bp ۷۵۰ و ۹ نمونه دارای قطعه تکثیر bp ۸۵۰ بودند

نتایج حاصل از برش ژن کواگولاز با استفاده از آنزیم برشیAluI، در شکل ۲ نشان داده شده است. برای هر محصول PCR، دو واکنش هضم به طور جداگانه با آنزیم AluI به عمل آمد. نتایج حاصل ٤ الگوی مختلف برش از ژن مورد نظر را نمایش می دهد. اما هر کدام از این الگوها مربوط به یک اندازه از محصولات تکثیری بوده و تنوع خاصی در داخل یک محصول تکثیری مشاهده نشد.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات حاصل از برش ژن کواگولاز با استفاده از آنزیم برشیAluI
M: مارکر،A: برش باند B،۸۵۰: برش باند C،۷۶۰:برش باند ۷۰۰ و D: برش باند ۶۰۰ جفت باز

بحث و نتیجه‌گیری

این پژوهش اولین مطالعه پلی مورفیسم ژن کوآگـواز در جدایه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* از شیر گـاومیش در ایران محسـوب شـده مـی‌شـود. مطالعـه چنـدی در خصـوص پلـی مرفیسـم ایـن ژن در *اسـتافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده از شیر گاو در خارج و داخـل کشـور وجود دارد (Ishino et Dastmalchi Saei et al., 2009 ;al., 2007)؛ ولـی بـه طـور کلـی مطالعـات انـدکی در خصـوص اسـتافیلوکوکوس‌هـای جـدا شـده از شـیر گاومیش در جهان انجام پذیرفته است. اخیراً مطالعـه در خصوص پلی مورفیسم ژن‌های *aroA* و *spa* در کشـور انجام و نتایج آن منتشـر شـده اسـت (Shayegh et al., 2013).

در مطالعه حاضر ٤ محصول مختلف PCR متعلـق بـه تکثیر انتهای ´ ۳ ژن *coa* بدسـت آمـده اسـت. مطالعـه مشابه توسط محققین دیگر نیز تنوع اندازه باند متعلق به ژن *coa* را تائید مـی‌نماینـد (Dastmalchi Saei et al., Reinoso et al., 2007; 2009). دلیل مشخصی برای این تنوع معین نشده ولـی احتمـالاً ردیـف‌هـای حـذفی یـا جایگزینی در داخل ژن کوآگواز موجب به وجود آمـدن چنین تنوعی می‌گردند و ایـن امـر احتمـالاً مـی‌بایسـتی موجب تغییر خصوصیات آنتی ژنی آنـزیم در انتهـای ´ ۳ ژن کواگـولاز نیـز گـردد (Dastmalchi Saei et al., 2009). شاید یکی از دلایل تنوع آنتـی ژنـی و مقاومـت عفونت‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* همین امر باشد. بـه هر حال نتایج مطالعه حاضر نشـان مـی‌دهـد کـه تنـوع بانـدی حاصـل از ژن *coa* در جدایـه‌هـای گاومیشـی

استافیلوکوکوس آرئوس مشابه تنوع‌های ژن مذکور در جدایه‌های گاوی آن است.

در مطالعه حاضر آنزیم Alu I بکار رفته و اگرچه ٤ الگوی مختلف برشی از ژن *coa* در جدایه‌های گاومیشی *استافیلوکوکوس آرئوس* را بدست داده ولی هر یک از این الگوها متعلق به یک نوع اندازه ژن *coa* بوده و این آنزیم نتوانست تفاوت و تنوع داخلی در سایز باندهای مختلف ژن *coa* را نشان دهد. در مطالعه دیگری هم، این آنزیم نتوانسته بود برش مناسب در ژن *coa*جدایه استافیلوکوکی گاوی ایجاد نماید (Stutzenberger and San Clemente, 1967)؛ بنابراین به نظر می‌رسد آنزیم مناسبی برای نشان دادن تنوع درونی در ژن *coa* نباشد ولی تجربیات موفقی در استفاده از آنزیم Hae III توسط دیگران گزارش شده‌اند (Dastmalchi Saei et al., 2009).

عقیده بر این است که غالب بودن الگوی خاصی از ژن کوآگولاز ممکن است با مقاوم بودن سویه‌های مذکور در برابر سیستم ایمنی میزبان مرتبط باشد این امر را می‌توان به نوعی فرار از سیستم ایمنی میزبان تلقی کرد. سویه‌های با اندازه ژنی ۷۰۰ و ۷۵۰ جفت باز آلی دارای چنین غالبیتی می‌باشند (Reinoso et al., 2007). اما برای بررسی تنوع داخل ژنی می‌بایست از آنزیم‌های برشی بیشتری که بتواند چنین تنوع را در داخل هر کدام از گروه‌های ژنی نشان دهد استفاده گردد.

منابع

- برومندی جزی، مسعود (١٣٨٤). پرورش گاومیش، انتشارات موسسه آموزشی عالی عامی کاربردی، چاپ اول.صفحه ٩٤-١٠٤.
- رضویلر، ودود (١٣٧٨). میکروب‌های بیمای‌زا در مواد غذایی و اپید میولوژی مسمومیت‌های غذایی انتشارات دانشگاه تهران صفحه ١٣٥-١٢٧.

- Bromandi Jazi, M. (2006). Buffaloes culture. Applied-scientific High educational institute, Tehran[In Farsi].
- Busch, U., Nitschko, H. (1999). Methods for the differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications ,722: 263–278.
- Dastmalchi Saei, H., Ahmadi, M., Mardani, K., Batavani, R.A. (2009). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. Veterinary Microbiology, 137: 202-206.
- Dastmalchi Saei, H. and Ahmadi, M. (2010). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on PCR-RFLP analysis of the aroA gene. Comparative Clinical Pathology, 19: 163-168.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J. and Spratt, B.G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 38:1008–1015.

- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J. and Kapur, V. (1997). Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. Epidemiology and Infection, 119: 261–269.
- Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. (1998) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. Journal of Clinical Microbiology.36:1083–1089.
- Ishino, K., Tsuchizaki, N., Ishikawa, J. and Hotta, K. (2007). Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism typing of the coagulase gene to discriminate arbekacin-resistant methicillinresistant Staphylococcus aureus strains. Journal of Clinical Microbiology, 45: 607–609.
- Marcos, J.Y., Soriano, A.C., Salazar, M.S., Moral, CH., Ramos, S.S., Smeltzer, M.S. and Carrasco, G.N. (1999). Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the aroA gene. Journal of Clinical Microbiology, 37: 570-574.
- Melles, D.C., van Leeuwen, W.B., Snijders, S.V., Horst-Kreft, D., Peeters, J.K., Verbrugh, H.A. and van Belkum, A. (2007). Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE),and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. Journal of Microbiological Methods, 69: 371–375.
- Razavilar, V. (1999). Pathogenic Microorganisms in foods and Epidemiology of food borne intoxication. Tehran University Press [In Farsi].
- Reinoso, E.B., El-Sayed, A., Lammler, C., Bogni, C. and Zschock, M., (2008). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. Microbiological Research, 163: 314–322.
- Shayegh, J., Barzegari, A. and Mikaili, P. (2013). Molecular characteristics of Staphylococcus aureus isolates from buffaloes milk. The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, 19 (4): 665-668.
- Strommenger, B., Braulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nubel, U. and Witte, W. (2008). spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. Journal of Clinical Microbiology, 46: 574–581.
- Stutzenberger, F.J. and San Clemente, C.L. (1967). Nephelometric assay of bovine ntistaphylocoagulase serum. Journal of Bacteriology, 94(4): 821–825.
- Weller, T.M. (2000). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus typing methods: which should be the international standard?. Journal of Hospital Infection, 44:160–172.